

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791535

研究課題名（和文）淋菌の感染細胞における細胞周期の分子機構と病原性に関する研究

研究課題名（英文）Analysis of the cell cycle in infected culture cell of *Neisseria gonorrhoeae*.

研究代表者

志牟田 健 (SHIMUTA KEN)

国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究者番号：40370960

研究成果の概要（和文）：

淋菌感染細胞にて引き起こされる G1 停止の普遍性について検討した。系統の異なる様々な株 (MLST 解析において) の G1 停止能について確認した。宿主細胞は HeLa 細胞を用いた。異なる 40 系統の菌株において、有意に G1 期停止を起こした株はなかった。僅かに有意差が認められた 2 株についてサイトカイン産生の量的変化を調べたが、菌株間における有意差は認められなかった。これらのことは淋菌感染細胞における G1 停止は、淋菌感染時における一般的な現象ではなくある特定の株によって引き起こされる可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I confirmed the universality of G1 arrest caused by gonococcus infection in culture cell. I examined about the G1 arrest ability of various strains varied by MLST analysis. The host cell used HeLa cell. In the strain of 40 different phylaxis, there was not the strains which significantly caused G1 arrest. Significant difference slightly examined a quantitative alteration of the cytokine production about approved two strains, but the significant difference between the strains was not recognized. These results indicated that the possibility that the G1 arrest in the gonococcus infection cell was caused by the certain strain which was not a general phenomenon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H21 年度	1,600,000	0	1,600,000
H22 年度	1,600,000	0	1,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	0	3,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：淋菌感染症、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

近年の性行動の変化に伴い、性感染症 (sexually transmitted diseases:STDs) 罹患者の低年齢化が顕著である。世界的には、性器クラミジア感染症が 8300 万症例、淋菌感染症が 6300 万症例、とされる。また淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) とクラミジア (*Chlamydia trachomatis*) の複合感染が難治療化をする場合もあり、更に HIV 感染リスクを高めていることが報告されている。

感染経路はヒト-ヒト感染のみで、男性は尿道、女性は子宮頸管に主に感染する。男性には急性尿道炎、女性では子宮頸管炎、更には卵管炎などの骨盤内炎症性疾患を引き起こす。女性の場合、不顕性感染が 50-80%を示すとされ、これらの無症候キャリアが持続的感染源となり、また女性不妊の一因とも考えられている。淋菌の宿主細胞に対する影響という視点では、未だに未解明な部分が多い。最近、淋菌感染細胞の細胞周期に関する興味深い論文が報告された (The FASEB Journal, 2007;21:345-355)。それによると、*in vitro* における淋菌感染 HeLa 細胞では感染 24 時間後にサイクリン B1、サイクリン D1、サイクリン E の量的な減少を伴い、G1 停止をおこした。G1 期に、充分量のサイクリン D1、サイクリン E が確保出来ずに S 期移行が阻害されたと推測される。しかし、この量的な減少の機構は不明である。また、サイクリン D1 は外来のシグナルと細胞周期を結ぶ上で重要なタンパク質としても知られている。G1 停止機構である G1/S チェックポイントでは、ゲノム DNA の損傷で、PI3 キナーゼである ATM/ATR の活性化、もしくは転写因子である p53 の活性化によって、G1 停止が誘発される。また DNA ダメージチェックポイントとは非依存的に細胞の接触障害 (contact inhibition)、飢餓状態 (serum starvation)、TGF β などの刺激によっても G1 停止は引き起こされる。細

菌感染時の宿主細胞の細胞周期を修飾する細胞側の因子 Cyclomodulin について多くの報告がなされている。その中でも細胞周期を負に制御する因子が複数同定されてきた。しかし、淋菌感染細胞の G1 停止について、それを引き起こす細菌側の因子並びに G1 停止がおこる宿主細胞の詳細な解析は行われていない。淋菌と同属である髄膜炎菌 (*Neisseria meningitides*) 感染 HeLa 細胞では G1 停止は認められなかった。このことは近縁種でも宿主細胞に対する反応性の相違性を示唆している。更に、宿主細胞の両菌種に対する反応性を調べたマイクロアレイの結果でも、この二つの菌種に対する宿主細胞応答性の違いが示された。その中で非感染細胞と比べ淋菌感染細胞特異的に BMP-RIA (TGF- β superfamily) の上昇が認められた。TGF- β superfamily は先に述べたように G1 停止の関与が考えられ、淋菌感染による何らかの刺激で分泌された TGF- β superfamily が G1 停止に関与している事が推測される。淋菌感染におけるサイトカイン産生と宿主細胞の細胞周期に与える影響については現在、国内外問わず議論されていない。

2. 研究の目的

本研究において、淋菌感染と宿主細胞の細胞周期停止のメカニズムについて詳細な検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 淋菌感染によって引き起こされる G1 停止が、普遍的であるかについては全く議論されていない。そこで MLST による系統解析が判明している淋菌株を使用し G1 停止の優位差があるのか確認する。

(2) 淋菌感染における G1 停止と一般的な

G1/S チェックポイントの関与について検討する。主に淋菌感染の G1 停止が DNA ダメージに依存したものであるかの確認する。

(3) サイトカイン産生による細胞周期停止の関与について検討するため、ELISA を用いて淋菌感染時のサイトカインの産生を調べる。

4. 研究成果

(1) 淋菌感染細胞における G1 停止の普遍性について

淋菌感染によって引き起こされる G1 停止の普遍性について検討するために、系統的に異なる (MLST による解析) 40 株について G1 停止能について検討した。宿主細胞は、HeLa 細胞を用いた。G1 期停止の確認は cdk2 のリン酸化状態を指標にウエスタンブロットにて確認した。感染条件を MOI=10, 50, 100, 500 とし、感染時間は 1 時間から 3 時間まで一時間単位で検討した。G1 期停止の陽性コントロールは、thymidine 処理した細胞を用いた。今回調べた 40 株では、有意に G1 期停止を起こした株はなかったが、系統の異なる 2 株において僅かに cdk2 のリン酸化状態に差がみられた。

(2) 淋菌感染細胞における DNA ダメージの確認

淋菌感染時における宿主細胞の DNA ダメージの有無を確認した。DNA ダメージの確認はヒストン H2AX の 139th-Ser のリン酸化状態を指標にウエスタンブロットにて確認した。その結果、(1) で述べた 2 株を含めた合計 10 株において DNA ダメージは確認されなかった。

(3) 淋菌感染時における菌株間のサイトカイン産生の量的変化の解析

(1) で述べた 2 株を含む系統の異なる 10 株についてサイトカイン (IL-8、TNF- α 及び、BMP-RIA) 産生の量的変化を ELISA にて調べたが、菌株間におけるこれらのサイトカイン産生の有意差は認められなかった。

本研究において、淋菌感染細胞における G1 停止は、淋菌感染時における一般的な現象ではなくある特定の株によって引き起こされる可能性を示唆した。今回検討した臨床分離株は主に男性の尿道炎由来株であった。淋菌感染細胞において G1 停止を引き起こすような株は、尿道炎などの臨床症状を起こすような株ではなくむしろ不顕性感染可能な菌株であることが考えられる。現在、不顕性感染を引き起こす特異的な淋菌株は明らかにされていない。不顕性感染した淋菌株を分離同定するのは困難ではあるが、今後、健診等でこのような株が分離同定されれば、淋菌感染における G1 停止能の解明に寄与するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Nakajo N, Deno Y, Ueno H, Kenmochi C, Shimuta K and Sagata N. Temporal and spatial expression patterns of Cdc25 phosphatase isoforms during early Xenopus development, International Journal of Developmental Biology, (査読: 有), in press, 2011

2. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Kitawaki J, and Unemo M. Is Neisseria gonorrhoeae initiating a future era of untreatable gonorrhoea? - Detailed

characterization of the first high-level ceftriaxone resistant strain. Antimicrob Agents Chemother, (査読: 有) in press, 2011

3. Ohnishi M, Ono E, Shimuta K, Watanabe H and Okamura N Identification of TEM-135 β -Lactamase in Penicillinase -Producing *Neisseria gonorrhoeae* Strains in Japan. Antimicrob Agents Chemother, 54(7): 3021-3023, 2010 (査読: 有)

4. Ohnishi M, Watanabe Y, Ono E, Takahashi C, Oya H, Kuroki T, Shimuta K, Okazaki N, Nakayama S, and Watanabe H. Spreading of a chromosomal cefixime resistant penA gene among different *Neisseria gonorrhoeae* lineages. Antimicrob Agents Chemother, 54(3) : 1060-1067, 2010 (査読: 有)

[学会発表] (計 1 件)

志牟田 健
簡易的な淋菌のスクリーニング系の検討
日本性感染症学会第 23 回学術大会
平成 22 年 12 月 11 日 福岡市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :

番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等
<http://www.nih.go.jp/niid/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
志牟田 健 (SHIMUTA KEN)
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号 : 40370960

(2) 研究分担者
(なし)

研究者番号 :

(3) 連携研究者
(なし)

研究者番号 :